イオン交換-セルファインは、多孔性球状セルロース粒子をベースとした、生体高分子に対して高吸着容量であり高流速が可能なイオン交換クロマトグラフィーメディアです。

<材料>

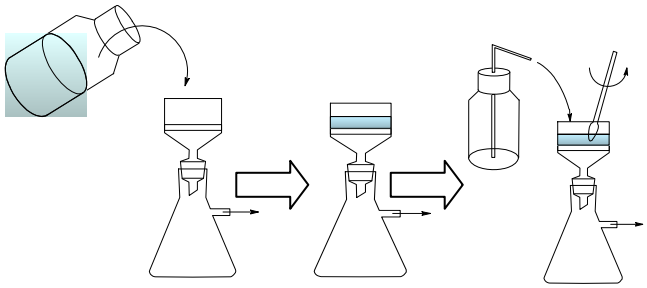
イオン交換-セルファイン、*中低圧カラム、ポンプ/吸引ビン

ガラスフィルターor ブフナーロート、充填バッファー

＊　中低圧カラムは、各社販売のカラムが使用できます。

＊　充填バッファーは、吸着バッファーを用いる事を推奨します。

<ゲルスラリーの調整>



・　使用する材料を室温にする。

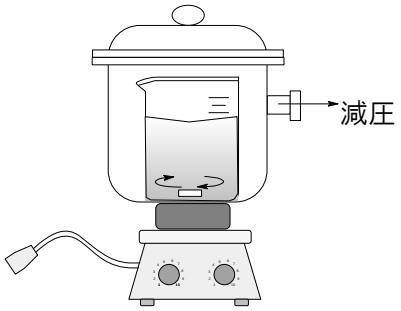
・　製品のボトルを数回振り、スラリーを均一にする。

・　吸引ろ過により保存剤（20%EtOH）を吸引除去する。

・　純水で EtOH 臭が無くなるまでろ過洗浄する。

・　ビーカーに、脱水ゲルと充填バッファーを加え、良く撹拌した後、吸引ろ過をする（２～３回）。（充填バッファーは脱水ゲル容量のおおよそ１～1.5 倍使用する）

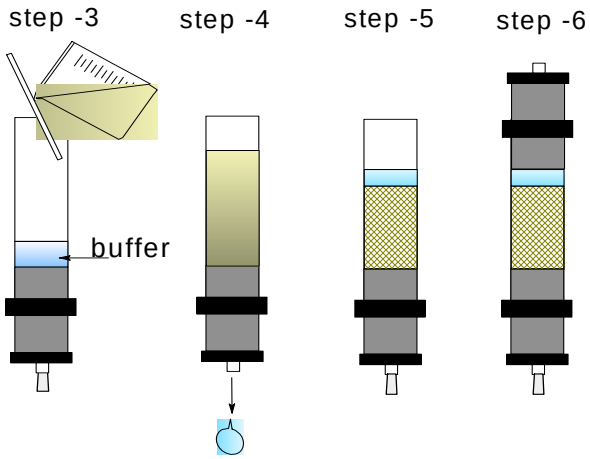
・　ビーカーに、脱水ゲルと充填バッファーを加えおおよそ 40%～60%のスラリーを調製し、減圧下で 30 分～40 分脱気する。



※脱気する際にマグネチックスターラーで緩やかに撹拌するとより効果的に脱気できます。

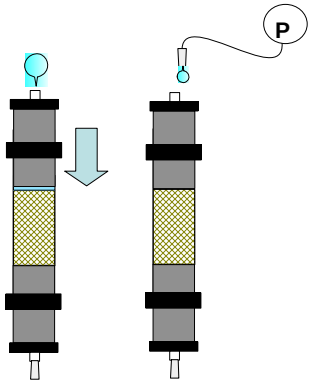
<カラムの充填>

1. カラムの組立て、操作方はカラムの取扱説明書を参照ください。
2. カラムの下部に栓をして少量の充填バッファーを加えておく。（カラムのゲルサポートは脱気しておく）
3. 脱気したゲルスラリーを良くかき混ぜて均一にして、カラム内へ注ぎ込む
4. カラム下部のよりバッファーを流出させて、ゲルベットを形成させる。
5. 目的の高さよりやや高い（1cm-2cm）までゲルベットを形成させ、更にその上部にバッファーを 1cm-2cm になるように加えて、カラム下部のプラグをする
6. カラム上部のゲルサポートをセットする。



<カラムの平衡化>

1. 充填したカラムをポンプにつなぎ、充填バッファーを流してゲルベットを安定化させます。送液圧力はおよそ 1-2MPa 以下で行います。
2. カラムベッドが安定したら（高さが安定したら）カラム高さを調整する。多い場合は駒込ピペットで取り除く、少ない場合はゲルを加える。
3. 希望のカラム高さになったら、ベットサポートをゲルベット上面に密着させる。



・　カラム下部のプラグをする

・　上部サポーターを徐々に下ろす。（カラム上部出口より液がでてくる）

・　液の満たされたラインをカラム上部に接続する。

4.　平衡化バッファーをゲルベッド体積の５倍程度流す。

※平衡化が達成されれば、カラム溶出液のｐ H とイオン強度は、充填バッファーと同じになります。

<サンプルの調整>

添加するサンプルのイオン強度は充填バッファー（結合バッファー）と同じかそれ以下になるように調整します。結合バッファーに対してサンプルを透析するか、より簡単にするためには、セルファイン GH25 によるバッファー交換ゲルろ過によってサンプルを調整することができます。

サンプル量は、イオン交換容量や標準タンパク質の吸着量を参考にして求めますが、高分離能を求める場合は、吸着容量の 10%-20%が適当と言われています。

サンプルの中の不溶物は、カラムへ添加する前に、メンブランフィルターで除去しておきます。

<流速>

サンプルの結合と溶出の際の流速は、分離能に影響します。通常、流速が低い方が高分離になります。

<吸着>

目的のサンプルをイオン交換セルファインに吸着させる場合、イオン強度とｐ H に注意が必要です。通常イオン強度は５０ｍM 以下の低イオン強度でｐ H は目的のサンプルの等電点(ｐ *I*)よりもｐ H 値で１以上違う事が必要です。

※　DEAE、Q などの陰イオン交換では吸着バッファーは目的サンプルのｐ *I* よりもｐ H 値を１よりも高く設定する。反対に CM や P、S などの陽イオン交換では目的サンプルのｐ *I* よりもｐ H 値を１よりも低く設定する。

※　一般的な使用法と反対に、不純物を吸着させて、目的サンプルをパスさせる方法もあります。

<溶出>

イオン交換体からの目的サンプルの溶出には、NaCl の直線的なグラジエントが一般的に採用されている。グラジエントはカラム体積の５倍から 10 倍の容積で、吸着バッファーに含まれる NaCl 濃度を最終的に 0.5mol/L 程度まで増加させる。目的サンプルが溶出されない場合には、更に高濃度の NaCl を流すか、バッファーの pH を変えてみる。

NaCl の直線的グラジエントのほかにも、NaCl 濃度のステップワイズ溶出や pH グラジエント、pH ステップワイズによる溶出もできます。

<再生>

高イオン強度のバッファー（1-2mol/L NaCl　含有バッファー）を用いて溶出液のＵＶをモニターし十分値が低く、変化がなくなるまで洗浄する。その後、再び吸着バッファーで平衡化する。

<Cleaning-in-place (CIP)>

再生と同じ操作で、イオン的に吸着した物質を洗浄したのち 0.1mol/L の NaOH をカラム体積の５倍程度流す。ゲルの汚れが著しい場合は 1mol/L の NaOH でカラム体積の５倍程度流す。その後、吸着バッファーで平衡化する。疎水性の強い物質を洗浄するためには、70%の EtOH や 30%IPA で洗浄する。この場合、グラジエントで溶媒の濃度を上げ下げすることでカラムに気泡が発生することを避ける。※有機溶剤を使用する場合、カラムに気泡が発生しやくなる。発生した場合は再度カラムの充填が必要。

<保存>

開封後のセルファイン を保存する場合は、良く洗浄した後に、20%エタノールに液を置換して、２～８℃で保存されることを推奨いたします。

<安定性>

１M酢酸/MeOH/EtOH/６M塩酸グアジニン/８M尿素/１%トライトンＸは室温７日間放置。0.5mol/L NaOH / 0.5mol/L NaOH+1M NaCl / 0.1N HCl は室温３０日放置。オートクレーブ(120℃60 分)。以上の処理後のイオン交換容量、流速、膨潤度、タンパク質の吸着量には変化が無かった。

<イオン交換セルファイン製品案内>

品名	タイプ	官能基
セルファイン A-200	弱陰イオン交換	ｼﾞｴﾁﾙｱﾐﾉｴﾁﾙ基
セルファイン A-500		
セルファイン A-800		
セルファイン C-500	弱陽イオン交換	ｶﾙﾎﾞｷｼﾒﾁﾙ基
セルファイン Q-500	強陰イオン交換	第４級ｱﾝﾓﾆｳﾑ基
セルファイン S-500	強陽イオン交換体	ｽﾙﾎﾝ基

ミニカラム(1ml, 5ml)の製品もあります。

JNC株式会社

〒100-8105 東京都大手町二丁目２番１号
ライフケミカル推進室
電話 03-3243-6150　FAX 03-3243-6219

URL:http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine
e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp